

**USSN 10/566,030**

**Exhibit A to**

**Amendment Filed 6-28-2010**

Belslestein, *Ann.* 120, 229 (1851). Dextrorotatory glyceric acid is obtained from the salts of *Malic* or *Aspergillus* on the DL-form. McKeown, Harden, *J. Chem. Soc.* 83, 431 (1903). Levorotatory glyceric acid has been obtained by the oxidation of DL- $\alpha$ -glyceric aldehyde: Wohl, Schellenberg, *Ber.* 55, 1408 (1922).

DL-Form: syrup, dec on datura. K at 23°. 2.6  $\times$  10<sup>-4</sup>.

Miscellaneous with water, alcohol, acetone. Nearly insol in ether.

DL- $\alpha$ -Form: syrup. Its esters and salts are levorotatory and its salts are much more sol in water than those of the DL-form.

L-Form calcium salt:  $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2)_2\text{H}_2\text{O}$ , monoclinic prisms; sol in water, alcohol, acetone. One gram dissolves in 10 ml water.  $[\alpha]_D^{25} = -67^\circ$  ( $c = 5$ ).

D-Form: syrup. Its salts are dextrorotatory.

D-Form calcium salt:  $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2)_2\text{H}_2\text{O}$ , prisms, mp 138°.  $[\alpha]_D^{25} = +4.5^\circ$  ( $c = 5$ ).

4347. Glycerol, 1,2,3-Propanetriol; glycerine; trihydroxypropane; incorporation factor, IFP.  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ; mol wt 92.09. C 39.12%, H 8.73%, O 52.12%.  $\text{CH}_3\text{OCHOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ . Obtained from oils and fats as hydrogen in the manuf of soaps and fatty acids. During World War I supplementary quantities were produced by the "Protein" process, a process from which a process based on the fission of acetaldehyde by sodium sulfite. Just prior to World War II the synthesis of glycerol from propylene was announced. Production from sugar by fermentation: Onishi, U.S. pat. 3,012,945 (1961 to Noda). Identical with incorporation factor. Amino acid with incorporation factor. In nucleic acid the incorporation factor may exist as a bound form of glycerol. Reviews and bibliographies: J. W. Lawrie, *Glycerol and the Glycols* (New York, 1928); G. Leffingwell, M. Lesser, *Glycerin* (Brooklyn, 1945); C. S. Miner, N. Dalton, *Glycerin* (New York, 1953); L. L. Lippard, *Glycerin and glycerol esters* (St. Heidenheim, 2nd ed., 1955); J. C. Kirk-Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology* vol. 11 (Wiley-Interscience, New York, 3rd ed., 1980) pp 921-932.

Syrupy lit. Sweet waxy taste. About 0.6 times as sweet as cane sugar. Insol in water, insol in ether, H<sub>2</sub>S,  $\text{HCl}$ ,  $\text{SO}_2$ . **Caution:** Contact with strong oxidizing agents such as chromium trioxide, potassium chlorate, or potassium permanganate may produce an explosion. Neutral to litmus. Solidifies after prolonged cooling at 0° forming shiny orthorhombic crystals, mp +17.8°, bp 200°, decomposes bp 231°. Viscosity (cps. at 20°): 1.020.01.  $[\eta]_D^{25} = +28.01^\circ$  ( $c = 1.22$ ); bp 153.8°; bp 125.5°,  $[\eta]_D^{25} = +1.4758$ ;  $n_D^{20} = 1.4746$ ;  $n_D^{25} = 1.4730$ ; bp 1265.57;  $d_4^{25} = 1.26362$ ;  $d_4^{25} = 1.26201$ . Flash pt, open cup, 176°C (176°C). Specific gravities of 95% aq soln w/v (U.S.P. grade):  $d_4^{25} = 1.2570$ ;  $d_4^{25} = 1.24910$ ; 90% aq soln:  $d_4^{25} = 1.2520$ ;  $d_4^{25} = 1.2460$ ; 85% aq soln:  $d_4^{25} = 1.213$ ;  $d_4^{25} = 1.185$ ; 50% aq soln:  $d_4^{25} = 1.157$ ; 50% aq soln:  $d_4^{25} = 1.129$ ; 20% aq soln:  $d_4^{25} = 1.049$ ; 5% aq soln:  $d_4^{25} = 1.0122$ . Viscosity (cps. at 20°): 5% aq soln: 1.143; 10% 1.311; 25% 2.095; 50% 6.050; 60% 10.96; 70% 22.94; 85% 57.50; 90% 166.00.  $[\eta]_D^{25} = +28.01^\circ$  ( $c = 1.22$ ); bp 153.8°; bp 125.5°,  $[\eta]_D^{25} = +1.4758$ ;  $n_D^{20} = 1.4746$ ;  $n_D^{25} = 1.4730$ ; bp 1265.57;  $d_4^{25} = 1.26362$ ;  $d_4^{25} = 1.26201$ . Miscible with water, alcohol. One part dissolves in 11 parts ethyl acetate, in about 500 parts ethyl ether. Insol in benzene, chloroform, carbon tetrachloride, carbon disulfide, petr ether, oils. LD<sub>50</sub> orally, i.v. in rats: > 20, 4.4 mg/kg. W. Bartsch et al., *Arzneimitt.-Forsch.* 26, 1581 (1976).

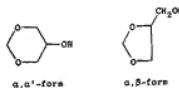
Used as solvent for cellulose, as emulsifier, as emollient, in the manuf of nitroglycerol (dynamite), cosmetics, liquor, liqueurs, confectionery, blacking, printing and copying inks, lubricants, elastic glues, lead oxide cements; to keep fabrics pliable; to preserve printing on cotton; for printing rollers, lithographs; to keep leather from cracking; as a fire retardant; as a water meter and hydrometer backs; in shock absorber fluids. In fermentation nutrients in the production of antibiotics. Leffingwell and Lesser (op. cit.) give 1583 different uses.

THERAP CAT: Pharmaceutical aid (thumectant); solvent.

THERAP CAT (VET): Emollient, emollient, vehicle. As a source of glucose in bovine ketosis.

4348. Glycerol Formal. Methylidinoglycerol. Glycerin-formal: Senicols N.  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$  mol wt 104.10. C 46.13%, H 7.74%, O 46.11%. Mixture of isomeric  $\alpha$ -D- and  $\alpha$ -L-forms prep'd from glycerine and formaldehyde: M. Schulte, B.

*Tetrahedron*, *Ann.* 289, 20 (1895). Propn and separation of isomers: H. Hibbert, N. M. Carter, *J. Am. Chem. Soc.* 50, 3123 (1928); J. D. van Rosan, *Rec. Trav. Chim.* 48, 173 (1929). Toxicological evaluation for use as pharmaceutical solvent: D. M. Sanderson, *J. Pharm. Pharmacol.* 11, 150, 446 (1959). Teratogenicity studies: V. Aliverti et al., *Arch. Sci. Biol.* 61, 89 (1977); E. Giavini, M. Prati, *Acta Anat.* 106, 203 (1980).



Liquid, bp<sub>40</sub> 191-195°, bp<sub>70</sub> 95-97°,  $d_4^{25} = 1.121$ ;  $n_D^{25} = 1.451$ . Sol in water, cl. chloroform, pH of 10% soln: 4-6.5. LD<sub>50</sub> in rats: 8.6 mg/kg orally, 3.5 ml/kg i.v. P. Gimeno, *Span. Pat.* 475,662 (1979 to Calipe). C. A. 93, 26445 (1980).

$\alpha$ -Form: 1,3-dioxan-5-ol,  $\alpha, \alpha'$ -methylene glycerin,  $\alpha, \alpha'$ -dimethylene glycerol, 5-m-dioxanol bp 193.8°,  $d_4^{25} = 1.2200$ ;  $n_D^{25} = 1.4527$ .

$\alpha$ -D-Form: 1,3-dioxolane-4-methanol,  $\alpha, \beta$ -methylene glycerin,  $\alpha$ -formaldehyde glycerol, (4-hydroxymethyl)-1,3-dioxolane, bp 192.5°,  $d_4^{25} = 1.2088$ ;  $n_D^{25} = 1.4469$ .

THERAP CAT: Pharmaceutical aid (solvent).

4349. Glycerophosphoric Acid. Phosphoric acid glycerol ester:  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_5\text{P}$ ; mol wt 171.08. C 45.94%, H 5.27%, O 55.79%. *Chem. & Ind.* (London) 1958, 1000.  $\text{CH}_3\text{OPO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ . The  $\text{L}-\alpha$ -acid is the naturally occurring form; the  $\beta$ -acid, present in hydrolyzates of lecithins from natural sources, arises from an epoxide of glycerol with one chiral atom. See review: Dawson, *Ann. Rep. Prog. Chem. (Chim. Soc. London)* 55, 365 (1958). Propn by phosphorylation of glycerol results in a mixture of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids: Cherbuliez, Weniger, *Helv. Chim. Acta* 29, 2006 (1946). Prepn and configuration of  $\text{L}-\alpha$ -acid: Bäuerle, *Biochem. Z.* 231 (1940). Separation of  $\alpha$ -acid from  $\beta$ - and polyglycerophosphoric acids: Carrara, *Ital. pat.* 460,219 (1950). *C. A.* 46, 507a (1950).

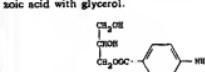
Absolute acid (commercial mixture of  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids): *Chem. & Ind.* (London) 1940, 1000. Tends to dec during storage, form usually marked as a 25-50% soln. Soluble in water, alcohol.

$\alpha$ -Acid: L-form, syrup. Readily sol in water, methanol, ethanol, practically insol in ether. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +1.45 (berium salt,  $c = 10.3$  in 2*N* HCl).

$\beta$ -Acid: D- and L-forms are fatty acid esters of glycerophosphoric acid.

use: Absolute acid used to manuf certain glycerophosphates or to impart taste to soaps, glycerophosphates which are generally used medicinally. See also: Calcium Glycerophosphate.

4350. Glyceryl p-Aminobenzoate, 1,2,3-Propanetriol-1-(*p*-aminobenzoate); *p*-aminobenzoate, *alpha*-(1,2,3-propanetriol-1-monoxy-*p*-aminobenzoate); *Esabol* 16.  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{NO}_3$ ; mol wt 214.21. C 66.82%, H 6.20%, N 6.63%.  $n_D^{20} = 1.60-1.67$ .  $d_4^{25} = 1.20-1.25$ .  $[\eta]_D^{25} = 34.86$ .  $d_4^{25} = 1.205$ . Prep'd by controlled esterification of *p*-aminobenzoic acid with glycerol.



Semisolid, waxy mass or syrup. Paint aromatic odor. Liquifies and congeals very slowly. Soluble in methanol, ethanol, isopropanol, glycerol, propylene glycol. Insol in water, oil, fat.

use: In cosmetic sunscreen prepn (up to 1%).

4351. Glyceryl Iodide. 3-Iodo-1,2,3-propanetriol; *p*-iodopropenylglycol; 3-iodo-1,2-dihydroxypropane.  $\text{C}_3\text{H}_2\text{IOr}$

USSN 10/566,030

Exhibit B to

Amendment Filed 6-28-2010

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of:

Angelo Ariotto et al.

Group Art Unit: 1616

Serial No.: 10/566,030

Examiner: Fisher, Abigail L

Filed: January 17, 2006

For: A CLEANSING COMPOSITION BASED ON OILY SUBSTANCES

**DECLARATION**

I, Elisabetta Merlo, hereby declare the following:

1. My scientific curriculum is attached as annex 3 to the present declaration; I am presently acting as an employee of Zschimmer & Schwarz Italiana S.r.l., and I am a co-inventor of the above-identified patent application.
2. The invention provides a cleansing composition based on oily substances, useful for cleansing skin and/or hair and having excellent dermatological properties. The composition of the invention comprises one or more oily substances at a total concentration of 30% to 70% by weight and a surfactant selected from N-acylates of amino acids, peptides and proteins of Formula (I) or mixtures thereof, at a total concentration of 10% to 40% by weight. The composition of the invention has a water content not greater than 10% by weight. The composition of the invention is in a liquid form.
3. Prior to the invention of the above-identified application, N-acylates of amino acids, peptides and proteins of Formula (I) were known in the prior art as surfactants suitable for use in cosmetic formulations such as, *inter alia*, soaps.
4. The reference International Journal of Toxicology, 20(Suppl.1):1-14, 2001, cited by the Examiner in the Office Action dated January 27, 2010, discloses the use of acyl sarcosines and sarcosinates as surfactant-cleansing agents in cosmetic formulations. This reference specifically discloses the use of Sodium Lauroyl Sarcosinate at concentrations of 2.78% to 6.86% in two liquid soaps and at concentrations of 12.5% to 12.9% in a bar soap.

5. Gerber et al. in US Patent No. 5653988, cited by the Examiner in the Office Action dated January 27, 2010, disclose a shower oil containing not more than 55% by weight of one or more surfactants selected from the group of fatty alcohol ethoxylates, fatty alcohol sulphates, amides of fatty alcohol sulphates, fatty alcohol ether sulphates, amides of fatty alcohol ether sulphates, fatty acid monoethanolamides, fatty acid diethanolamides, and not less than 45% by weight of one or more oil components selected from the group of oils with a high content of triglycerides of saturated and/or unsaturated, branched and/or unbranched fatty acids, or exclusively such triglycerides. The shower oil disclosed in Gerber et al. is essentially anhydrous. It may contain optional components such as further surfactants, as well as further cosmetic or pharmaceutical auxiliaries, additives, active substances.

According to column 3, lines 32-36 of Gerber et al., it is preferred to employ mixtures of MIPA laureth sulphate, laureth-4 and Cocamide-DEA, such as e.g. the surfactant mixture marketed by Zschimmer & Schwarz under the trade name ZETESOL®100.

6. Stork et al. in US Patent No. 6620773, cited by the Examiner in the Office Action dated January 27, 2010, disclose a foaming oil preparation extremely well tolerated by the skin, mucosa and eyes, which comprises at least a surfactant mixture and an oil component. The surfactant mixture comprises at least an anionic or zwitterionic surfactant, a nonionic surfactant and an alkyl phosphate compound. Specific examples of such surfactant mixtures are provided in the examples.

7. However, neither Gerber et al. nor Stork et al. mention as suitable surfactants the N-acylates of amino acids, proteins and peptides of Formula (I) identified in Claim 1 of the present patent application.

8. Attached herewith, as annexes 1 and 2, are two experimental reports concerning eye irritation tests performed to evaluate the tolerability of a cosmetic formulation falling within the definition of Claim 1 of the present patent application, that is to say a formulation of Oleoyl Sarcosine in bath oils.

The tolerability is expressed in terms of Inhibiting Concentration 50 ( $IC_{50}$ ), which is the concentration of the test formulation which is capable of inducing a 50% decrease in the cell growth/survival. The  $IC_{50}$  value is commonly used as an indication of the potential irritating effect of a test compound or formulation, an consequently of its tolerability (the lower the  $IC_{50}$ , the lower the tolerability).

As a comparison, the effects of two reference preparations, one containing the same surfactant (i.e. Oleoyl Sarcosine) but formulated in water, and the other based on bath

oils but containing a conventional surfactant mixture marketed as ZETESOL 100, were also evaluated under the same conditions.

9. A detailed description of the different formulations tested in annexes 1 and 2 is provided herein below.
  - (i) The formulation designated as **Sample A in Annex 1** (Oleoyl Sarcosine in water) consists of the following mixture:

55% Water  
31% Oleoyl Sarcosine  
6.4% AMP (Amino methyl propanole)  
7.6% Laureth-4 (ethoxylated alcohol)

The product is a turbid viscous gel giving rise to a murky solution at the concentration used in the test.
  - (ii) The formulation designated as **Sample B in Annex 2** (Oleoyl Sarcosine in bath oil) consists of the following mixture:

44% Glicine Soja  
11% Ricinus Communis  
31% Oleoyl Sarcosine  
6.4% AMP (Amino methyl propanole)  
7.6% Laureth-4 (ethoxylated alcohol)

The water content is less than 0.1%. The product is a clear amber liquid.
  - (iii) The formulation designated as **Sample A In Annex 2** (Market Leader Bath Oil) contains the following ingredients (INCI names indicated on the label):

Glycine Soja, MIPA-Laureth Sulfate, Ricinus Communis, Laureth-4, Cocamide DEA, Poloxamer 101, Parfum, Triticum Vulgare, Citric Acid, Aqua, Panthenol, BHT, Propyl Gallate, Linalool, Butylphenyl Methylpropianol, Limonene, Citronellol, Geraniol, Hydroxyisohexyl 3-Cyclohexene Carboxaldehyde, Coumarin, Alpha-Isomethyl Ionone, Eugenol, Hexyl Cinnamal.

The surfactant is a mixture of MIPA-Laureth Sulfate, Laureth-4 and Cocamide DEA marketed as ZETESOL 100. The ZETESOL 100 total content in the product is 38-40%. The oil total content in the product is 55%. The product is a clear amber liquid
10. Annexes 1 and 2 are written both in Italian and in English. Annex 1 further contains the results obtained with a third formulation, designated as "Sample C". Such results as well as any information relating thereto have been deleted because Sample C does not relate to the case at issue.

11. The experiments in the experimental report were ordered to ABICH S.r.l., a certified service company (ISO 9001:2000) performing chemical and biological analysis, by Zschimmer & Schwarz Italiana S.r.l. The experiments were carried out by ABICH S.r.l. and the annexed reports were prepared by ABICH S.r.l.
12. I have reviewed the data illustrated in the reports and I affirm that the following conclusions can be drawn from the obtained results:

That the cosmetic formulation which is by far better tolerated is the formulation of Oleoyl Sarcosine in oils (Sample B in Annex 1), which is the formulation according to the present invention. The  $IC_{50}$  of Sample B in Annex 1 is 0.72 mg/ml, which is more than one order of magnitude higher than the  $IC_{50}$  of the formulation of Oleoyl Sarcosine in water (Sample A in Annex 2,  $IC_{50} = 0.03$  mg/ml).

Furthermore, the  $IC_{50}$  value of the formulation according to the present invention is exactly one order of magnitude higher than the  $IC_{50}$  of the Market Leader Bath Oil formulation (Sample A in Annex 1,  $IC_{50} = 0.072$  mg/ml).

It is worth noticing that the  $IC_{50}$  values of the formulation of Oleoyl Sarcosine in water and of the Market Leader Bath Oil formulation are of the same order of magnitude as the  $IC_{50}$  of the irritant positive control.

The significant reduction in the eye irritation potential observed with the formulation according to the present invention is therefore unexpected in the light of the high irritation potential of both reference formulations.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these were made with the knowledge that false statements made willfully are punishable by fine, imprisonment, or both a fine and imprisonment under Section 1001 of Title 18 of the United States; and further that false statements made willfully may jeopardize the validity of any patent issuing on a patent application in which the false statements were made.

Annexes 1 and 2: Experimental Reports

Annex 3: Scientific curriculum

Date: .....

Elisabetta Merlo

USSN 10/566,030

Exhibit C to

Amendment Filed 6-28-2010

# ANNEX 1



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I.Z.S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI  
VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

## ***Valutazione in vitro del potenziale di irritazione oculare di un prodotto cosmetico***

### ***In vitro evaluation of the eye irritation potential of a cosmetic product***

COMMITTENTE/CUSTOMER	Zschimmer & Schwarz Italia S.p.A. Via Angelo Ariotto, 1/C 13038 - Tricerro (VC) ITALY
PRODOTTO/PRODUCT	Three different cosmetic formulations
DATA RAPPORTO/REPORT DATE	28/09/2005
PROTOCOLLO N./REPORT N.	REL/0169/05/IRRO/ELB



ABICH S.r.l. - Tecnoparco del Lago Maggiore - Via dell'Industria 29/2 - 28924 Verbania ITALY

Phone: +39 (0)323/586239 Fax: +39 (0)323 496877 - e-mail: [info@abich.it](mailto:info@abich.it)

P.IVA/VAT n.: 01864020035



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E

DELL'EMILIA-ROMAGNA

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022801 TELEFAX ++ 030225613

## Premessa/Preliminary

Lo studio qui descritto riguarda la valutazione di sicurezza d'uso di prodotti cosmetici o dispositivi medici, tramite l'impiego di modelli di fibroblasti primari umani e la valutazione della loro citotossicità con il test NRU.

Questo rapporto contiene i dati sperimentali registrati durante l'esecuzione del test di tollerabilità eseguito sui prodotti in oggetto.

I risultati del test sono presentati sotto forma di tabelle e grafici riassuntivi per agevolare l'interpretazione.

La prima parte fornisce informazioni circa il committente, il prodotto testato, il tipo di test, il laboratorio esecutore, le date di inizio e di fine studio e l'identità degli sperimentatori.

La seconda parte descrive il protocollo sperimentale.

La terza parte riporta i risultati e le conclusioni.

Questo studio è stato condotto in stretta osservanza delle norme di Buona Pratica di Laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).

The present study concerns the *in vitro* safety evaluation of cosmetic products or medical devices, using human fibroblasts. Cytotoxicity through the NRU assay has been determined in order to assess the product safety.

This report contains the experimental data compiled during the *in vitro* safety evaluation studies of the tested substance.

The test results are presented in a concise table format for easy interpretation.

The first part provides information regarding sponsor and test product identifications, assay type, entrusted laboratory, study initiation and completion dates and supervisory personnel.

The second part describes the study design, including materials and procedures.

The test results are presented in the third and last part of the report.

The present study was carried out in strict compliance to Good Laboratory Practice (GLP) guidelines.



TECNOPARCO

Pagina 2 di 16  
REL/0169/05/IRRO/ELB

ABICH S.r.l. - Tecnoparco del Lago Maggiore- Via dell' Industria 29/2 - 28924 Verbania ITALY

Phone: +39 (0)323/586239 Fax: +39 (0)323 496877 - e.mail: [info@abich.it](mailto:info@abich.it)

P.IVA/VAT n.: 01864020035



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I.Z.S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)

TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

## Sommario/Summary

<b>1 PARTE PRIMA/PART ONE - INFORMAZIONI GENERALI/GENERAL INFORMATION</b>	4
1.1 COMMITTENTE/CUSTOMER: .....	4
1.2 CAMPIONE ANALIZZATO/TESTED SAMPLE: .....	4
1.3 TEST/ASSAY: .....	4
1.4 LABORATORIO INCARICATO/ENTRUSTED LABORATORY: .....	5
1.5 DATI DELLO STUDIO/STUDY DATES: .....	5
1.6 Sperimentatore/EXPERIMENTER: .....	5
1.7 SUPERVISORE SCIENTIFICO/SCIENTIFIC SUPERVISOR: .....	5
<b>2 PARTE SECONDA/PART TWO: PROTOCOLLO Sperimentale/ STUDY DESIGN</b>	6
2.1 SCOPO DEL TEST/ AIM OF THE TEST: .....	6
2.2 ESECUZIONE/ DBI TEST/ASSAY PROCEDURES: .....	7
2.2.1 Modelli adottati/Test systems: .....	7
2.2.2 Trattamento ed Esposizione/Treatment and Exposure: .....	7
2.2.3 Test di citotossicità NRU/The NRU cytotoxicity assay .....	8
<b>3 PARTE TERZA/PART THREE - RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS</b>	10
3.1 RISULTATI/RESULTS: .....	10
3.2 CONCLUSIONI/CONCLUSIONS: .....	14
<b>4 BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY</b>	16



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

## 1 PARTE PRIMA/PART ONE – INFORMAZIONI GENERALI/GENERAL INFORMATION

### 1.1 *Committente/Customer:*

Zschimmer & Schwarz Italia S.p.A.  
Via Angelo Ariotto, 1/C  
13038 - Tricerro (VC)  
ITALY

### 1.2 *Campione Analizzato/Tested Sample:*

Campione/Sample	Descrizione/Description
A = Market Leader per Olio da Bagno/ Market Leader Bath Oil	Liquido limpido ambra/ Clear amber liquid
B = Olio da Bagno con Oleoyl Sarcosina/ Bath Oil with Oleoyl Sarcosine	Liquido limpido ambra/ Clear amber liquid
C =	

In aggiunta, il Sodio Lauril Solfato (SLS) è stato aggiunto nell'esperimento come controllo positivo irritante.

In addition, as an irritant positive control, Sodium Lauryl Sulfate (SLS) was included in the experimental set.

### 1.3 *Test/Assay:*

- Citotoxicità attraverso il test NRU: test di sopravvivenza cellulare con fibroblasti umani coltivati in monolato per la valutazione del potenziale di irritazione oculare e della biocompatibilità.

Cytotoxicity by NRU test: cell survival assay using human fibroblasts in monolayer cultures to assess eye irritation potential and biocompatibility.



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I.Z.S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7/9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

**1.4 Laboratorio incaricato/Entrusted laboratory:**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia  
Romagna (Ente Sanitario di Diritto Pubblico)  
Laboratorio Ricerca applicata ai Substrati Cellulari  
Via Bianchi, 7/9 - 25100 Brescia - ITALY

**1.5 Date dello studio/Study dates:**

Inizio/Initiation: 29/08/2005  
Fine/End: 28/09/2005

**1.6 Sperimentatore/Experimenter:**

Dr. Marina Nadia Losio - Ricercatore/Researcher at IZSLER -  
Centro Ricerca Applicata ai Substrati cellulari  
Via Bianchi, 7/9 - 25100 Brescia - ITALY  
Phone-fax: +39 (0) 30 2290248

**1.7 Supervisore scientifico/Scientific supervisor:**

Dr. Elena Bochetto - Biologa specialista in Biotecnologie  
ABICH S.r.l. - Tecnoparco del Lago Maggiore  
Via delle Industrie 29/2 - 28924 Verbania  
Tel +39 (0)323 586239 - Fax +39 (0)323 496877

**Nota/ Note:**

Il risultato dei test citati nel presente rapporto si riferisce esclusivamente ai/ai prodotti/testati e alle particolari condizioni sperimentali impiegate nel test. Il presente rapporto non può essere riprodotto parzialmente senza il consenso preliminare scritto degli sperimentatori.

The results of the test in this report refer only to the tested products and to the particular experimental conditions here employed. This report cannot be partially duplicated without the preliminary written approval of the experimenters.



Pagina 5 di 16  
REL/0169/05/IRRO/ELB

ABICH S.r.l. - Tecnoparco del Lago Maggiore- Via dell' Industria 29/2 - 28924 Verbania ITALY  
Phone: +39 (0)323 586239 Fax: +39 (0)323 496877 - e-mail: [info@abich.it](mailto:info@abich.it)  
P.IVA/VAT n.: 01864020035



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

## **2 PARTE SECONDA/PART TWO: PROTOCOLLO SPERIMENTALE/ STUDY DESIGN**

### **2.1 Scopo del test/Aim of the test:**

I metodi *in vitro* costituiscono un'interessante alternativa ai metodi classici *in vivo* per la valutazione delle caratteristiche biologiche di ingredienti e prodotti finiti per uso cosmetico o biomedicale, in accordo con quanto stabilito dalle normative correnti che richiedono ai produttori cosmetici di verificare la sicurezza d'uso dei prodotti evitando l'impiego di animali (Basic Council Directive N° 76/768/ EEC del 27/07/76, EC L. 262 del 27/09/1976; VI Amendment Council Directive 93/35 EEC del 14/06/1993 ECL.151 del 23/06/1993). Analogamente, anche per i dispositivi medici le norme UNI/EN 10993 prevedono, dove possibile, l'impiego di test alternativi per limitarne l'uso.

Il saggio di citotoxicità può essere eseguito al fine di valutare la potenziale irritazione oculare di un prodotto o di un ingrediente o miscela di ingredienti utilizzando colture di fibroblasti prelevati da derma umano. Il test *in vitro* condotto su cellule derivate da tessuto cutaneo o epiteliale in genere risulta essere un metodo sperimentale semplificato, ma in grado di dare molte informazioni sulle reazioni che possono verificarsi *in vivo*. Test di citotoxicità eseguiti su fibroblasti o cheratinociti in monolato, sono stati ampiamente usati come indicatori predittivi del potenziale di irritazione oculare e cutaneo di prodotti per uso cosmetico o biomedicale. In particolare il modello utilizzato nel presente studio è rappresentato da fibroblasti di tipo primario, cioè provenienti da una biopsia di derma sano di un donatore.

L'obiettivo di questo test è stabilire quantitativamente gli effetti del materiale testato sulla vitalità cellulare attraverso il test di colorazione con il Neutral Red Uptake (NRU assay).

Il test NRU è un metodo chemio-sensibile per la vitalità cellulare, basato sull'abilità delle cellule vive di incorporare e legare il Rosso Neutro (RN), un colorante vitale. Il RN è un debole colorante cationico che penetra la membrana cellulare per diffusione non ionica e si accumula nei lisosomi dove si lega nei siti anionici della matrice. Alterazioni della superficie cellulare o della sensibilità della membrana lisosomiale portano alla fragilità dei lisosoma e ad altri cambiamenti che gradualmente diventano irreversibili.

Questi cambiamenti dovuti all'azione di xenobiotici portano ad una diminuzione dell' "uptake" e del legame del RN. Con questo metodo è possibile distinguere tra cellule vive, danneggiate o morte.

*In vitro* methods are an interesting alternative system to traditional *in vivo* tests to evaluate biological properties of biomedical and cosmetic products, according to the current European cosmetic rules that ask manufacturers to assess the product safety, without employing animals (Basic Council Directive N° 76/768/ EEC of the 27/07/76, EC L. 262 of the 27/09/1976; VI Amendment Council Directive 93/35 EEC of the 14/06/1993 ECL.151 of the 23/06/1993). Furthermore, the use of *in vitro* tests, instead of *in vivo* models, is strongly recommended by the UNI/EN 10993 rules.

Cytotoxicity assays can be carried out in order to evaluate *in vitro* the potential eye irritation of a product on fibroblasts cultures. The *in vitro* test on derma-derived cells is a simplified but yet very informative model of the reactions that may occur *in vivo*.

The cytotoxicity assay performed in this study was designed to evaluate the eye irritation potential of the tested product using relevant human cells grown *in vitro*.

Cytotoxicity test performed on human keratinocytes or fibroblasts in monolayer have been extensively used as indicator of the eye and skin irritation potential of a cosmetic product or of a medical device.

The objective of this assay was to assess quantitatively the effects of the test material on cell survival through the NRU (Neutral Red Uptake) assay.

TECNOPARCO

Pagina 6 di 15  
REL/0169/05/IRRO/ELB



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

The NRU assay is based on the cell ability to incorporate and bind the Neutral Red (NR), a vital dye. The NR is a weak cationic dye that penetrates the cell membrane through a mechanism of non ionic diffusion and that is accumulated in the lysosomes, on matrix anionic sites. Cell and lysosome membrane alterations cause lysosomes fragility and gradual irreversible changes in the cells. These changes induced by xenobiotics determinate the decrease of NR uptake and of its linkage to lysosomes. This method is able to discriminate alive, damaged or dead cells. Cells are incubated with scalar concentrations of the products and with the Neutral Red solution (NR). If the membrane is damaged, it releases the dye in the medium.

## 2.2 Esecuzione dei test/Assay procedures:

### 2.2.1 Modelli adottati/Test systems:

Il modello cellulare utilizzato per il test *in vitro* è rappresentato da: The *in vitro* test system employed consists of:

fibroblasti umani in colture monostato/ human primary fibroblasts in monolayer cultures.

I fibroblasti primari umani provengono da biopsie di cute pediatriche, ottenute con il permesso dei comitati etico da operazioni chirurgiche di routine. Il derma, da cui si ottengono i fibroblasti, è separato dall'epidermide tramite incubazione con dispasi. I fibroblasti sono stati coltivati in DMEM arricchito con 10% FCS (V/V) e con specifici supplementi.

Human primary fibroblasts come from paediatric foreskins, with ethic committees permission, from pre-planned routine surgery. The dermis, from which the cells are derived, was separated from epidermis by incubation with dispase. Fibroblasts were cultivated in DMEM enriched with 10% foetal calf serum (v/v) and specific enrichments.

### 2.2.2 Trattamento ed Esposizione/Treatment and Exposure:

In questo studio le cellule sono state piastrate fino a semiconfluenza. Quindi è stato aggiunto terreno di coltura fresco contenente la sostanza da testare in modo da raggiungere 6 diluizioni finali comprese tra 3 e 0,01 mg/ml. Ogni campione è stato testato in triplicato e gli esperimenti sono stati ripetuti due volte. Le cellule non trattate sono state utilizzate come controllo negativo mentre è stato utilizzato un tensioattivo di tossicità nota (Sodio Lauril Solfato, SLS) disciolto nel terreno di coltura alle concentrazioni comprese tra 0,1 mg/ml a 3 µg/ml come controllo positivo. L'esposizione è stata protratta per 24 h ed è stato poi eseguito il test di citotossicità (NRU) per valutare la percentuale di sopravvivenza cellulare. Il test NRU valuta l'impatto tossico delle sostanze in questione sulla vitalità cellulare.

These cells multiply in culture until a cell monolayer is reached. Once a confluence of 60-70% has been reached, fresh medium is added with scalar dilutions of the eluted tested product in a range between 3 and

0,01 mg/ml. Untreated cells are used as negative controls. Cells treated with a known irritating surfactant (Sodium Lauryl Sulfate -SLS) in concentration ranging from 0.1 mg/ml to 3 µg/ml were used as positive control. For each dilution, 3 replica were performed and repeated twice.

At 24 h of the exposure period a cytotoxicity assay was performed. The NRU assay, which measures the toxic impact on the cell.

TECNOPARCO  
Tecnoparco del Lago Maggiore

Pagina 7 di 16  
REL/0169/05/IRRO/ELB

ABICH S.r.l. - Tecnoparco del Lago Maggiore - Via dell' Industria 29/2 - 28924 Verbania ITALY

Phone: +39 (0)323/586239 Fax: +39 (0)323 496877 - e-mail: [info@abich.it](mailto:info@abich.it)

P.IVA/TVA N.: 01864020035



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E

DELL'EMILIA-ROMAGNA

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

### 2.2.3 Test di citotossicità NRU/The NRU cytotoxicity assay

Dopo l'incubazione, si sostituisce il terreno con terreno fresco più NRU, le cellule vengono incubate a 37 °C per 4h. Quindi vengono sottoposte a diversi lavaggi per eliminare i residui di colorante in eccesso e sottoposte a lettura colorimetrica.

Il risultato è espresso come:

$$\% \text{ sopravvivenza cellulare} = \frac{\text{OD cellule trattate} \times 100}{\text{OD cellule non trattate}}$$

After incubation, the medium is replaced with fresh medium + NR medium and cells are incubated for 4 h at 37°C. Then cells are washed more times to eliminate exceeding dye wastes and read at the colorimeter.

The results are expressed in terms of viability:

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{OD treated cells} \times 100}{\text{OD untreated control cells}}$$

#### 2.2.3.1 Espressione dei risultati/Expression of results:

I dati di citotossicità ottenuti con il test NRU sono messi in grafico contro la concentrazione del prodotto testato, creando una curva dose-risposta, che permette di determinare:

- la curva teorica di regressione
- il valore teorico di  $IC_{50}$  (concentrazione di inibizione della crescita del 50%) ovvero la concentrazione che induce una riduzione della vitalità cellulare del 50% rispetto alle cellule non trattate

I risultati di citotossicità sono stati corretti sottraendo le letture di assorbanza dovute al mezzo diluente.

**Il valore  $IC_{50}$  (Inhibiting Concentration 50) indica la concentrazione di prodotto necessaria per inibire la crescita cellulare del 50%.  $IC_{50}$  è un parametro che consente di valutare il potenziale irritante di un composto**



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

The cytotoxicity data obtained with the NRU assay were plotted against the concentrations, which generate dose-response curves that allow to determine:

- the theoretical regression curve
- the theoretical  $IC_{50}$  value (inhibiting concentration 50%), i.e. the concentration of test compound which causes a 50% decrease of cell survival as compared to untreated cultures

The cytotoxicity results have been corrected subtracting the cytotoxicity due to the diluent medium.

*The  $IC_{50}$  value (Inhibiting Concentration 50) is the concentration of test compound which induces a 50% decrease of cell growth/survival. It makes it possible to evaluate the potential irritating effect of the compound*



Pagina 9 di 16  
REL/0169/05/IRRO/ELB



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



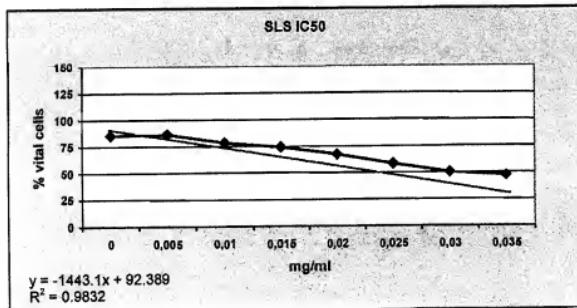
I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

### 3 PARTE TERZA/PART THREE - RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS

#### 3.1 Risultati/Results

SLS (controllo positivo/positive control)						
Dose mg/ml	0.5	0.12	0.03	0.008	0.002	0.00005
Assorbanza Media / Average adsorbance	0.083	0.080	0.223	0.397	0.411	0.536
Deviazione standard / Standard deviation	0.01	0.01	0.03	0.02	0.09	0.11
Vitalità cellulare % (rispetto al controllo negativo) / Cellular vitality % (respect the negative control)	18	17	47	84	87	114
$IC_{50} = 0.029 \text{ mg/ml}$						





**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi

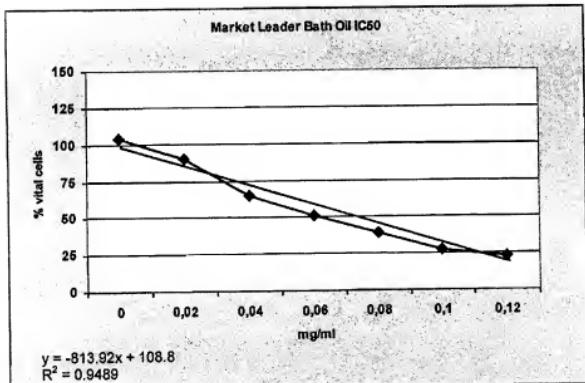


I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

<b>Campione A/Sample A</b>						
<b>MARKET LEADER BATH OIL</b>						
Dose mg/ml	1	0.33	0.11	0.037	0.012	0.004
Assorbanza Media / Average adsorbance	0.183	0.114	0.110	0.349	0.550	0.559
Deviazione standard / Standard deviation	0.03	0.01	0.02	0.04	0.01	0.03
Vitalità cellulare % (rispetto al controllo negativo) / Cellular vitality % (respect the negative control)	36	22	22	68	107	109

$IC_{50} = 0.072 \text{ mg/ml}$



TECNOPARCO

Pagina 11 di 16  
REL/0169/05/IRRO/ELB

ABICH S.r.l. - Tecnoparco del Lago Maggiore - Via dell' Industria 29/2 - 28924 Verbania ITALY  
Phone: +39 (0)323 586239 Fax: +39 (0)323 496877 - e-mail: info@abich.it

P.IVA/VAT n.: 01864020035



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

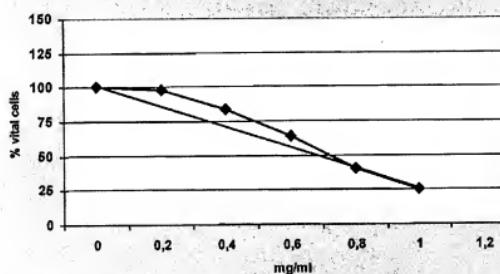
VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

**Campione B / Sample B**

**BATH OIL WITH OLEOYL SARCOSINE**

Dose mg/ml	1	0.33	0.11	0.037	0.012	0.004
Assorbanza Media / Average adsorbance	0.118	0.464	0.509	0.499	0.401	0.433
Deviazione standard / Standard deviation	0.02	0.13	0.01	0.05	0.07	0.13
Vitalità cellulare % (rispetto al controllo negativo) / Cellular vitality % (respect the negative control)	23	91	100	98	78	85
<b>IC<sub>50</sub> = 0.72 mg/ml</b>						

**Bath oil with oleoyl sarcosine IC<sub>50</sub>**



$$y = -90.019x + 114.54$$

$$R^2 = 0.9826$$



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



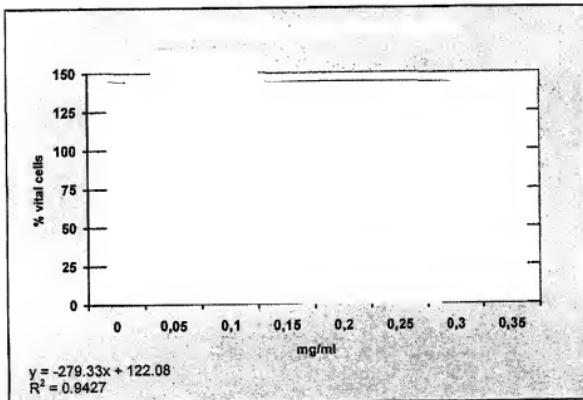
I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

**Campione C / Sample C**

Dose mg/ml						
Assorbanza Media / Average adsorbance						
Deviazione standard / Standard deviation						
Vitalità cellulare % (rispetto al controllo negativo) / Cellular vitality % (respect the negative control)						
<b>IC<sub>50</sub> =</b>						





**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



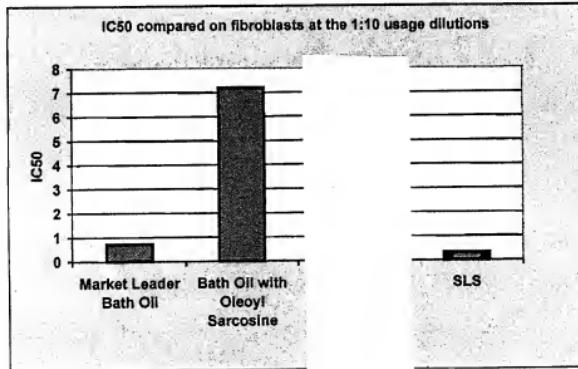
I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022801 TELEFAX ++ 030225613

### 3.2 Conclusioni/Conclusions

La tabella e la figura riassumono i risultati ottenuti. /Table and figure summarize the obtained results:

Prodotto/Product	IC <sub>50</sub> mg/ml	Diluizione d'uso/ Use Dilution	IC <sub>50</sub> teorica/ Theoretic IC <sub>50</sub> mg/ml
Market Leader Bath Oil	0,072	1:10	0,7
Bath Oil with Oleoyl Sarcosine	0,72	1:10	7,2
SLS	0,029	1:10	0,3





**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

Tenendo in considerazione un fattore di diluizione dei detergenti di 1:10 possiamo affermare che i campioni B e C hanno una buona biocompatibilità, per quanto concerne il potenziale irritante, nei confronti della cute e delle mucose. Il prodotto meglio tollerato è il campione B (olio da bagno con oleyol sarcosina).

Considering a 1:10 detergents dilution factor we can affirm that samples B and C have a good biocompatibility, regarding irritation power, versus skin and mucous membranes. The best tolerated product is sample B (oil bath with oleyol sarcosine).

Data/Date: 28/09/2005

Il Responsabile dello studio/ Study Monitor  
Dr. Elena Bocchietto



TECNOPARCO

Pagina 15 di 16  
REL/0169/05/IRRO/ELB

ABICH S.r.l. - Tecnoparco del Lago Maggiore- Via dell' Industria 29/2 - 28924 Verbania ITALY  
Phone: +39 (0)323/586239 Fax: +39 (0)323 496877 - e-mail: [info@abich.it](mailto:info@abich.it)  
P.IVA/VAT n.: 01864020035



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

#### **4 BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY**

1. Botham P.A., Earl L.K., Fentem J.H., Roguet R., van deSandt J.J.M. (1998) Alternative methods for skin irritation testing: the current status. ATLA 26: 195-211.
2. Ohno T., Futamura Y., Harihara A., Hatao M., Hayasaka A. (1998) Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE- VII. Details of the neutral red uptake assay. Alternatives to animal testing and experimentation, 5:131-145.
3. Balls M., Botham P.A., Bruner L.H., Spielmann H. (1995) The EC/IO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. Toxicol. In vitro, 9: 871-929.
4. Borenfreund, E. and Puerner, J. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24:119-124
5. Kupper, T.S. (1990). Immune and inflammatory processes in cutaneous tissue: mechanisms and speculations. *J. Clin. Invest.* 86:1783-1789.
6. Kupper, T.S. and Groves, R.W. (1995). The interleukin-1 axis and cutaneous inflammation. *J. Invest. Dermatology* 105, Suppl., 62-66.
7. Lawrence, J.N., Dickson, F.M. and Benford, D.J. (1997). Skin irritant-induced cytotoxicity and prostaglandin E<sub>2</sub> release in human skin keratinocyte cultures. *Toxicology in vitro* 11: 627-631.
8. Mossman, T. (1993). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.
9. Sauder, D.N. and Pastore, S. (1993). Cytokines in contact dermatitis. *Am. J. Contact Dermatitis* 4, 215-224.
10. Seibert, H., Balls, M., Fentem, J.H., Bianchi, V., Clothier, R.H., Dierickx, P.J., Ekwall, B., Garie, M.J., Gómez-Lechón, M.J., Gribaldo, L., Gólden, M., Liebsch, M., Rasmussen, E., Roguet, R., Shrivastava, R. and Walum, E. (1996). Acute toxicity testing *in vitro* and the classification and labelling of chemicals. ATLA 24:499-510.
11. Tsutsui, T., Tanaka, Y., Ushimura, A., Ide, T., Matsumura, M. and Barrett, J.C. (1997). In vitro cytotoxicity of diverse preparations used in dental practice to human gingival keratinocytes. *Toxicology in vitro* 11: 393-398.
12. Norma UNI EN ISO 10993-5 Valutazione biologica dei dispositivi medici – Prove per la citotossicità in vitro- Settembre 2000



TECNOPARCO

Pagina 16 di 16  
REL/0169/05/IRRO/ELB

USSN 10/566,030

Exhibit D to

Amendment Filed 6-28-2010

# ANNEX 2



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

## ***Valutazione in vitro del potenziale di irritazione oculare di un prodotto cosmetico***

## ***In vitro evaluation of the eye irritation potential of a cosmetic product***

COMMITTENTE/CUSTOMER	Zschimmer & Schwarz Italia S.p.A. Via Angelo Ariotto, 1/C 13038 - Tricerro (VC) ITALY
PRODOTTO/PRODUCT	Sample A
DATA RAPPORTO/REPORT DATE	23/01/2006
PROTOCOLLO N./REPORT N.	REL/12/06/IRRO/ELB



*Pagina 1 di 15  
REL/12/06/IRRO/ELB*



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

### Premessa/Preliminary

Lo studio qui descritto riguarda la valutazione di sicurezza d'uso di prodotti cosmetici o dispositivi medici, tramite l'impiego di modelli di fibroblasti primari umani e la valutazione della loro citotossicità con il test NRU.

Questo rapporto contiene i dati sperimentali registrati durante l'esecuzione del test di tollerabilità eseguito sui prodotti in oggetto.

I risultati del test sono presentati sotto forma di tabelle e grafici riassuntivi per agevolare l'interpretazione.

La prima parte fornisce informazioni circa il committente, il prodotto testato, il tipo di test, il laboratorio esecutore, le date di inizio e di fine studio e l'identità degli sperimentatori.

La seconda parte descrive il protocollo sperimentale.

La terza parte riporta i risultati e le conclusioni.

Questo studio è stato condotto in stretta osservanza delle norme di Buona Pratica di Laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).

The present study concerns the *in vitro* safety evaluation of cosmetic products or medical devices, using human fibroblasts. Cytotoxicity through the NRU assay has been determined in order to assess the product safety.

This report contains the experimental data compiled during the *in vitro* safety evaluation studies of the tested substance.

The test results are presented in a concise table format for easy interpretation.

The first part provides information regarding sponsor and test product identifications, assay type, entrusted laboratory, study initiation and completion dates and supervisory personnel.

The second part describes the study design, including materials and procedures.

The test results are presented in the third and last part of the report.

The present study was carried out in strict compliance to *Good Laboratory Practice* (GLP) guidelines.



TECNOPARCO  
HUB LAGO MAGGIORE

Pagina 2 di 15  
REL/12/06/IRRO/ELB



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

## Sommario/Summary

<b>1 PARTE PRIMA/PART ONE - INFORMAZIONI GENERALI/GENERAL INFORMATION .....</b>	<b>4</b>
1.1 COMMITTENTE/CUSTOMER: .....	4
1.2 CAMPIONE ANALIZZATO/TESTED SAMPLE: .....	4
1.3 TEST/ASSAY: .....	4
1.4 LABORATORIO INCARICATO/ENTRUSTED LABORATORY: .....	5
1.5 DATE DELLO STUDIO/STUDY DATES: .....	5
1.6 Sperimentatore/EXPERIMENTER: .....	5
1.7 SUPERVISORE SCIENTIFICO/SCIENTIFIC SUPERVISOR: .....	5
<b>2 PARTE SECONDA/PART TWO: PROTOCOLLO Sperimentale/ STUDY DESIGN .....</b>	<b>6</b>
2.1 SCOPO DEL TEST/AIM OF THE TEST: .....	6
2.2 ESECUZIONE DEI TEST/ASSAY PROCEDURES: .....	7
2.2.1 <i>Modelli adottati/Test systems:</i> .....	7
2.2.2 <i>Trattamento ed Esposizione/Treatment and Exposure:</i> .....	7
2.2.3 <i>Test di clutossicità NRU/The NRU cytotoxicity assay</i> .....	8
<b>3 PARTE TERZA/PART THREE - RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS.....</b>	<b>10</b>
3.1 RISULTATI/RESULTS.....	10
3.2 CONCLUSIONI/CONCLUSIONS.....	ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.
<b>4 BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY.....</b>	<b>15</b>





**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

## **1 PARTE PRIMA/PART ONE – INFORMAZIONI GENERALI/GENERAL INFORMATION**

### **1.1 *Committente/Customer:***

Zschimmer & Schwarz Italia S.p.A.  
Via Angelo Arlotto, 1/C  
13038 - Tricerro (VC)  
ITALY

### **1.2 *Campione Analizzato/Tested Sample:***

Campione/Sample	Descrizione/Description
A = Formulazione con Oleoyl Sarcosina in acqua/ Formulation with Oleoyl Sarcosine in water	Gel turbido viscoso/ Turbid viscous gel

In aggiunta, il Sodio Lauryl Solfato (SLS) è stato aggiunto nell'esperimento come controllo positivo irritante.

In addition, as an irritant positive control, Sodium Lauryl Sulfate (SLS) was included in the experimental set.

### **1.3 *Test/Assay:***

- Citotossicità attraverso il test NRU: test di sopravvivenza cellulare con fibroblasti umani coltivati in monostrozzato per la valutazione del potenziale di irritazione oculare e della biocompatibilità.

Cytotoxicity by NRU test: cell survival assay using human fibroblasts in monolayer cultures to assess eye irritation potential and biocompatibility.



TECNOPARCO  
TECNO-PARK

Pagina 4 di 15  
REL/12/06/IRRO/ELB



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7/9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

**1.4 Laboratorio incaricato/Entrusted laboratory:**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (Ente Sanitario di Diritto Pubblico)  
Laboratorio Ricerca applicata ai Substrati Cellulari  
Via Bianchi, 7/9 - 25100 Brescia - ITALY

**1.5 Date dello studio/Study dates:**

Inizio/Initiation: 09/01/2006  
Fine/End: 23/01/2006

**1.6 Sperimentatore/Experimenter:**

Dr. Marina Nadia Losio – Ricercatore/Researcher at IZSLER –  
Centro Ricerca Applicata ai Substrati cellulari  
Via Bianchi, 7/9 - 25100 Brescia - ITALY  
Phone-fax: +39 (0) 30 2290248

**1.7 Supervisore scientifico/Scientific supervisor:**

Dr. Elena Bocchietto – Biologa specialista in Biotecnologie  
ABICH S.r.l. – Tecnoparco del Lago Maggiore  
Via delle Industrie 29/2 – 28924 Verbania  
Tel +39 (0)323 586239 – Fax +39 (0)323 496877

**Nota/ Note:**

Il risultato dei test citati nel presente rapporto si riferisce esclusivamente ai/ai prodotti testati e alle particolari condizioni sperimentali impiegate nel test. Il presente rapporto non può essere riprodotto parzialmente senza il consenso preliminare scritto degli sperimentatori.

The results of the test in this report refer only to the tested product/s and to the particular experimental conditions here employed. This report cannot be partially duplicated without the preliminary written approval of the experimenters.



Pagina 5 di 15  
REL/12/06/IRRO/ELB

ABICH S.r.l. - Tecnoparco del Lago Maggiore - Via dell' Industria 29/2 – 28924 Verbania ITALY  
Phone: +39 (0)323/586239 Fax: +39 (0)323 496877 - e.mail: info@abich.it  
P.IVA/VAT n.: 01864020035



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

## **2 PARTE SECONDA/PART TWO: PROTOCOLLO SPERIMENTALE/ STUDY DESIGN**

### **2.1 Scopo del test/Aim of the test:**

I metodi *in vitro* costituiscono un'interessante alternativa ai metodi classici *in vivo* per la valutazione delle caratteristiche biologiche di ingredienti e prodotti finiti per uso cosmetico o biomedicale, in accordo con quanto stabilito dalle normative correnti che richiedono ai produttori cosmetici di verificare la sicurezza d'uso dei prodotti evitando l'impiego di animali (Basic Council Directive N° 76/768/ EEC del 27/07/76, EC L. 262 del 27/09/1976; VI Amendment Council Directive 93/35 EEC del 14/06/1993 ECL.151 del 23/06/1993). Analogamente, anche per i dispositivi medici le norme UNI/EN 10993 prevedono, dove possibile, l'impiego di test alternativi per limitarne l'uso.

Il saggio di citotossicità può essere eseguito al fine di valutare la potenziale irritazione oculare di un prodotto o di un ingrediente o miscela di ingredienti utilizzando colture di fibroblasti prelevati da derma umano. Il test *in vitro* condotto su cellule derivate da tessuto cutaneo o epiteliale in genere risulta essere un metodo sperimentale semplificato, ma in grado di dare molte informazioni sulle reazioni che possono verificarsi *in vivo*. Test di citotossicità eseguiti su fibroblasti o cheratinociti in monostato, sono stati ampiamente usati come indicatori predittivi del potenziale di irritazione oculare e cutanea di prodotti per uso cosmetico o biomedicale. In particolare il modello utilizzato nel presente studio è rappresentato da fibroblasti di tipo primario, cioè provenienti da una biopsia di derma sano di un donatore.

L'obiettivo di questo test è stabilire quantitativamente gli effetti del materiale testato sulla vitalità cellulare attraverso il test di colorazione con il Neutral Red Uptake (NRU assay).

Il test NRU è un metodo chemio-sensibile per la vitalità cellulare, basato sull'abilità delle cellule vive di incorporare e legare il Rosso Neutro (RN), un colorante vitale. Il RN è un debole colorante cationico che penetra la membrana cellulare per diffusione non ionica e si accumula nei lisosomi dove si lega nei siti anionici della manica. Alterazioni della superficie cellulare o della sensibilità della membrana lisosomiale portano alla fragilità del lisosoma e ad altri cambiamenti che gradualmente diventano irreversibili. Questi cambiamenti dovuti all'azione di xenobiotici portano ad una diminuzione dell' "uptake" e del legame del RN. Con questo metodo è possibile distinguere tra cellule vive, danneggiate o morte.

*In vitro* methods are an interesting alternative system to traditional *in vivo* tests to evaluate biological properties of biomedical and cosmetic products, according to the current European cosmetic rules that ask manufacturers to assess the product safety, without employing animals (Basic Council Directive N° 76/768/ EEC of the 27/07/76, EC L. 262 of the 27/09/1976; VI Amendment Council Directive 93/35 EEC of the 14/06/1993 ECL.151 of the 23/06/1993). Furthermore, the use of *in vitro* tests, instead of *in vivo* models, is strongly recommended by the UNI/EN 10993 rules.

Cytotoxicity assays can be carried out in order to evaluate *in vitro* the potential eye irritation of a product on fibroblasts cultures. The *in vitro* test on derma-derived cells is a simplified but yet very informative model of the reactions that may occur *in vivo*.

The cytotoxicity assay performed in this study was designed to evaluate the eye irritation potential of the tested product using relevant human cells grown *in vitro*.



TECNOPARCO  
DEL LAGO MAGGIORE

pagina 6 di 15  
REL/12/06/RRO/ELB

ABICH S.r.l. - Tecnoparco del Lago Maggiore - Via dell' Industria 29/2 - 28924 Verbania ITALY

Phone: +39 (0)323 586239 Fax: +39 (0)323 496877 - e-mail: [info@abich.it](mailto:info@abich.it)

P.IVA/VAT n. 01864020035



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

Cytotoxicity test performed on human keratinocytes or fibroblasts in monolayer have been extensively used as indicator of the eye and skin irritation potential of a cosmetic product or of a medical device.

The objective of this assay was to assess quantitatively the effects of the test material on cell survival through the NRU (Neutral Red Uptake) assay.

The NRU assay is based on the cell ability to incorporate and bind the Neutral Red (NR), a vital dye. The NR is a weak cationic dye that penetrates the cell membrane through a mechanism of non ionic diffusion and that is accumulated in the lysosomes, on matrix anionic sites. Cell and lysosome membrane alterations cause lysosomes fragility and gradual irreversible changes in the cells. These changes induced by xenobiotics determinate the decrease of NR uptake and of its linkage to lysosomes. This method is able to discriminate alive, damaged or dead cells. Cells are incubated with scalar concentrations of the products and with the Neutral Red solution (NR). If the membrane is damaged, it releases the dye in the medium.

## 2.2 Esecuzione dei test/Assay procedures:

### 2.2.1 Modelli adottati/Test systems:

Il modello cellulare utilizzato per il test *in vitro* è rappresentato da: The *in vitro* test system employed consists of:

fibroblasti umani in colture monostato/ human primary fibroblasts in monolayer cultures.

I fibroblasti primari umani provengono da biopsie di cute pediatriche, ottenute con il permesso del comitato etico da operazioni chirurgiche di routine. Il derma, da cui si ottengono i fibroblasti, è separato dall'epidermide tramite incubazione con dispesi. I fibroblasti sono stati coltivati in DMEM arricchito con 10% FCS (V/V) e con specifici supplementi.

Human primary fibroblasts come from paediatric foreskins, with ethic committees permission, from pre-planned routine surgery. The dermis, from which the cells are derived, was separated from epidermis by incubation with dispase. Fibroblasts were cultivated in DMEM enriched with 10% foetal calf serum (V/V) and specific enrichments.

### 2.2.2 Trattamento ed Esposizione/Treatment and Exposure:

In questo studio le cellule sono state piastrate fino a semiconfluenza. Quindi è stato aggiunto terreno di coltura fresco contenente la sostanza da testare in modo da raggiungere 6 diluizioni finali comprese tra 3 e 0,01 mg/ml. Ogni campione è stato testato in triplicato e gli esperimenti sono stati ripetuti due volte.

Le cellule non trattate sono state utilizzate come controllo negativo mentre è stato utilizzato un tensioattivo di tossicità nota (Sodio Lauril Solfato, SLS) disciolto nel terreno di coltura alle concentrazioni comprese tra 0,1 mg/ml a 3 µg/ml come controllo positivo. L'esposizione è stata protratta per 24 h ed è stato poi eseguito il test di citotossicità (NRU) per valutare la percentuale di sopravvivenza cellulare. Il test NRU valuta l'impatto tossico delle sostanze in questione sulla vitalità cellulare.



TECNOPARCO  
DEL LAGO MAGGIORE

Pagina 7 di 15  
REL/12/06/RRO/ELB

ABICH S.r.l. - Tecnoparco del Lago Maggiore - Via dell' Industria 29/2 - 28924 Verbania ITALY

Phone: +39 (0)323/586239 Fax: +39 (0)323 496877 - e.mail: info@abich.it

P.IVA/VAT n.: 01864020035



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

These cells multiply in culture until a cell monolayer is reached. Once a confluence of 60-70% has been reached, fresh medium is added with scalar dilutions of the eluted tested product in a range between 3 and 0,01 mg/ml. Untreated cells are used as negative controls. Cells treated with a known irritating surfactant (Sodium Lauryl Sulfate -SLS) in concentration ranging from 0,1 mg/ml to 3 µg/ml were used as positive control. For each dilution, 3 replica were performed and repeated twice. At 24 h of the exposure period a cytotoxicity assay was performed. The NRU assay, which measures the toxic impact on the cell.

### 2.2.3 Test di citotossicità NRU/The NRU cytotoxicity assay

Dopo l'incubazione, si sostituisce il terreno con terreno fresco più NRU, le cellule vengono incubate a 37 °C per 4h. Quindi vengono sottoposte a diversi lavaggi per eliminare i residui di colorante in eccesso e sottoposte a lettura colorimetrica.

Il risultato è espresso come:

$$\% \text{ sopravvivenza cellulare} = \frac{\text{OD cellule trattate} \times 100}{\text{OD cellule non trattate}}$$

After incubation, the medium is replaced with fresh medium + NR medium and cells are incubated for 4 h at 37°C. Then cells are washed more times to eliminate exceeding dye wastes and read at the colorimeter.

The results are expressed in terms of viability:

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{OD treated cells} \times 100}{\text{OD untreated control cells}}$$

#### 2.2.3.1 Espressione dei risultati/Expression of results:

I dati di citotossicità ottenuti con il test NRU sono messi in grafico contro la concentrazione del prodotto testato, creando una curva dose-risposta, che permette di determinare:

- la curva teorica di regressione
- il valore teorico di IC<sub>50</sub> (concentrazione di inibizione della crescita del 50%) ovvero la concentrazione che induce una riduzione della vitalità cellulare del 50% rispetto alle cellule non trattate

I risultati di citotossicità sono stati corretti sottraendo le letture di assorbanza dovute al mezzo diluente.

**Il valore IC<sub>50</sub> (Inhibiting Concentration 50) indica la concentrazione di prodotto necessaria per inibire la crescita cellulare del 50%. IC<sub>50</sub> è un parametro che consente di valutare il potenziale irritante di un composto**



TECNOPARCO  
del Lago Maggiore

Pagina 8 di 15  
REL/12/06/IRRO/ELB

ABICH S.r.l. - Tecnoparco del Lago Maggiore - Via dell' Industria 29/2 - 28924 Verbania ITALY

Phone: +39 (0)323 586239 Fax: +39 (0)323 496877 - e-mail: [info@abich.it](mailto:info@abich.it)

P.IVA/VAT n.: 01864020035



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225813

The cytotoxicity data obtained with the NRU assay were plotted against the concentrations, which generate dose-response curves that allow to determine:

- the theoretical regression curve
- the theoretical  $IC_{50}$  value (inhibiting concentration 50%), i.e. the concentration of test compound which causes a 50% decrease of cell survival as compared to untreated cultures

The cytotoxicity results have been corrected subtracting the cytotoxicity due to the diluent medium.

*The  $IC_{50}$  value (Inhibiting Concentration 50) is the concentration of test compound which induces a 50% decrease of cell growth/survival. It makes it possible to evaluate the potential irritating effect of the compound*



TECNOPARCO  
del Lago Maggiore

Pagina 9 di 15  
REL/12/06/IRRO/ELB

AB/CH S.r.l. - Tecnoparco del Lago Maggiore- Via dell' Industria 29/2 - 28924 Verbania ITALY  
Phone: +39 (0)323/586239 Fax: +39 (0)323 496877 - e-mail: [info@abich.it](mailto:info@abich.it)  
P.IVA/VAT n.: 01864020035



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022801 TELEFAX ++ 030225613

### 3 PARTE TERZA/PART THREE - RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS

#### 3.1 Risultati/Results

SLS (controllo positivo/positive control)						
Dose $\mu\text{g/ml}$	100,0	60,0	25,0	12,5	6,3	3,1
Vitalità cellulare % (rispetto al controllo negativo)/ % cell viability (vs negative control)	31,64	41,58	71,69	92,62	96,47	103,93
d.s. exp	3,39	13,06	6,29	11,02	12,66	11,08

$\text{IC}_{50} = 42,7 \text{ } \mu\text{g/ml}$

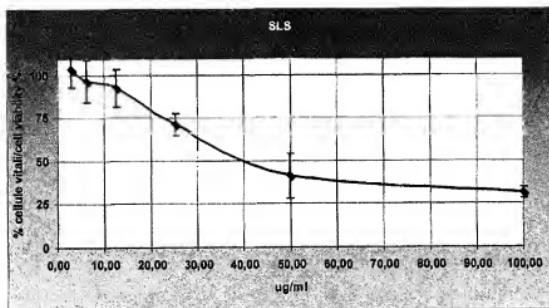


Figura 1/Figure 1: Espressione della vitalità cellulare dopo trattamento con dosi crescenti di SLS/Cell vitality expression after treatment with increasing amount of SLS



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

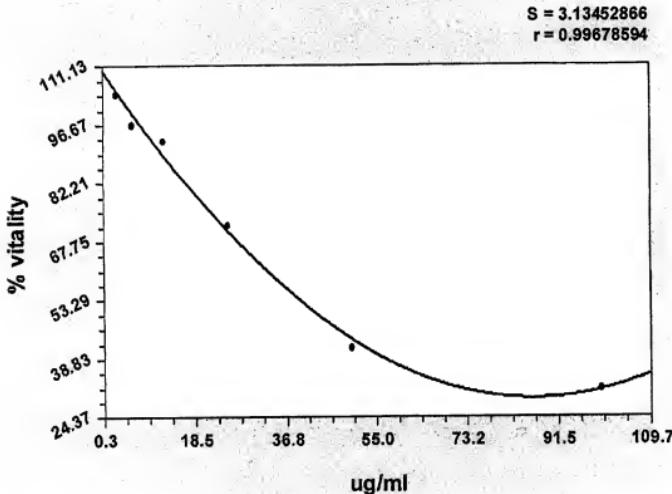


Figura 2/Figure 2: Interpolazione dell' equazione matematica relativa all' espressione della vitalità cellulare dopo trattamento con dosi crescenti di SLS /Interpolation of the mathematic equation linked to the expression of cell vitality with increasing amount of SLS



TECNOPARCO  
DEL LAGO MAGGIORE

Pagina 11 di 15  
REL/12/06/IRRO/ELB



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi

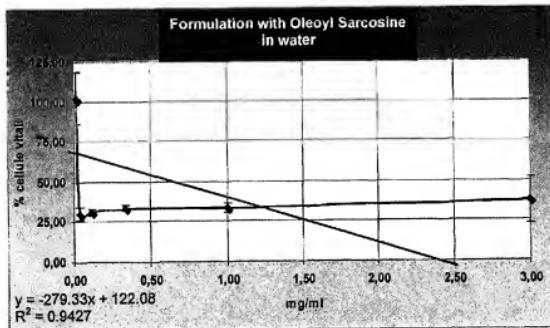


I.Z.S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

<b>Campione A / Sample A</b>						
<b>FORMULATION WITH OLEOYL SARCOSINE IN WATER</b>						
Dose mg/ml	3,00	1,00	0,33	0,11	0,04	0,01
Vitalità cellulare % (rispetto al controllo negativo) / Cellular vitality % (respect the negative control)	37,62	33,33	33,58	31,03	29,92	102,10
Deviazione standard / Standard deviation	14,42	2,70	2,12	1,87	4,12	16,08
<b>IC<sub>50</sub> = 0,03 mg/ml</b>						



**Figura 3/****Figure 3:** Espressione della vitalità cellulare dopo trattamento con dosi crescenti di prodotto / Cell vitality expression after treatment with increasing amount of the product



TECNOPARCO  
IN LAGO MAGGIORE

Pagina 12 di 15  
REL/12/06/IRRO/ELB



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

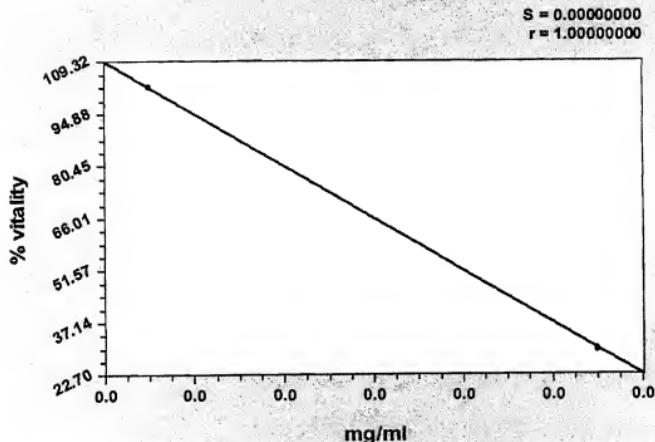


Figura 4/Figure 4: Interpolazione dell' equazione matematica relativa all' espressione della vitalità cellulare dopo trattamento con dosi crescenti di Campione A /Interpolation of the mathematic equation linked to the expression of cell vitality with increasing amount of Sample A



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. R. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

### 3.2 Conclusioni/Conclusions

Sulla base dei risultati sopra riportati il: /On the bases of the results here shown, the:

#### **Oleoyl sarcosine in acqua / Oleoyl sarcosine in water**

è risultato avere un potenziale citotossico/irritante per la mucosa oculare.

did show a predictive cytotoxic/irritating potential for the eye mucosae.

Data/Date: 23/01/2006

Il Responsabile dello studio/ Study Monitor  
Dr. Elena Bocchietto



ABICH S.r.l. - Tecnoparco del Lago Maggiore- Via dell' Industria 29/2 - 28924 Verbania ITALY  
Phone: +39 (0)323/586239 Fax: +39 (0)323 496877 - e.mail: [info@abich.it](mailto:info@abich.it)  
P.IVA/VAT n.: 01864020035



**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-8 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022801 TELEFAX ++ 030225613

#### **4 BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY**

1. Botham P.A., Earl L.K., Fentem J.H., Roguet R., van deSandt J.J.M. (1998) Alternative methods for skin irritation testing: the current status. ATLA 26: 195-211.
2. Ohno T., Futamura Y., Harihara A., Hatao M., Hayasaka A. (1998) Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE- VIII. Details of the neutral red uptake assay. Alternatives to animal testing and experimentation, 5:131-145.
3. Balls M., Botham P.A., Bruner L.H., Spielmann H. (1995) The EC/WHO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. Toxicol. In vitro, 9: 871-929.
4. Borenfreund, E. and Puerner, J. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24:119-124.
5. Kupper, T.S. (1990). Immune and inflammatory processes in cutaneous tissue: mechanisms and speculations. *J. Clin. Invest.* 86:1783-1789.
6. Kupper, T.S. and Groves, R.W. (1995). The interleukin-1 axis and cutaneous inflammation. *J. Invest. Dermatology* 105, Suppl., 62-66.
7. Lawrence, J.N., Dickson, F.M. and Benford, D.J. (1997). Skin irritant-induced cytotoxicity and prostaglandin E<sub>2</sub> release in human skin keratinocyte cultures. *Toxicology in vitro* 11: 627-631.
8. Mossman, T. (1993). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.
9. Sauder, D.N. and Pastore, S. (1993). Cytokines in contact dermatitis. *Am. J. Contact Dermatitis* 4, 215-224.
10. Selbert, H., Balls, M., Fentem, J.H., Bianchi, V., Clothier, R.H., Dierickx, P.J., Ekwall, B., Garfe, M.J., Gómez-Lechón, M.J., Gribaldo, L., Gülden, M., Liebsch, M., Rasmussen, E., Roguet, R., Shivastava, R., and Walum, E. (1996). Acute toxicity testing *in vitro* and the classification and labelling of chemicals. ATLA 24:499-510.
11. Tsutsui, T., Tanaka, Y., Ushimura, A., Ide, T., Matsumura, M. and Barrett, J.C. (1997). In vitro cytotoxicity of diverse preparations used in dental practice to human gingival keratinocytes. *Toxicology in vitro* 11: 383-398.
12. Norma UNI EN ISO 10993-5 Valutazione biologica dei dispositivi medici – Prove per la citotoxicità in vitro- Settembre 2000



Pagina 15 di 15  
REL/12/06/IRRO/ELB

USSN 10/566,030

Exhibit E to

Amendment Filed 6-28-2010

**Elisabetta Merlo  
Scientific Curriculum**

Elisabetta Merlo was born on January 11, 1968. She lives in Via Giolito Ferrari 5, 13039 TRINO, VERCCELLI, ITALY.

1992 Degree in Chemical and Pharmaceutical Technologies with a work on asbestos.

2002 Master in Cosmetic Sciences and Technologies with a work on the use of acylated aminoacids in emulsions.

Since 1993 works as Quality Control Manager at Zschimmer & Schwarz Italiana, also involved in research and development projects.

List of publications:

Ariotto, F. Guala, E. Merlo, G. Villa, Skin and hair benefit from wheat protein, Manufacturing Chemist (February 1996)

Ariotto A., Gazzaniga G., Guala F., Merlo E., Villa G., Zinc lauryl ether sulphate, Cosmetic Technology 3(2) 17-24 (2000)

L. Rigano, R. Trenti, F. Guala, E. Merlo, G. Villa, Selective deterion, SOFW-Journal, (1/2) 52-60 (2003)

Ariotto, F. Guala, E. Merlo, G. Villa, Multifunctional Surfactants: new perspectives and applications, Household and Personal Care Today, Supplement to Chemistry Today, 59-61 (2004)

Rigano L., Merlo E., Guala F., Giovanni V., Gazzaniga G., Zinc Coceth Sulphate, a Depositino-type Multifunctional Active. Equilibrium and Functional Parameters in Aqueous Solutions in the Stratum Corneum, IFSCC Orlando (2004)

C. Paolucci, S. Burastero, E. Merlo, F. Guala, G. Villa, E. Bocchietto, Nuovi tensioattivi per pelli sensibili a base di Sali di Zinc: inibizione della risposta allergica nichel-indotta, SIDAPA Salerno (2004)

F. Guala, N. Lionetti, E. Merlo, G. Villa, Enhancement of Wash Resistance and Functionality in Hair Colouring by Sodium Methyl Cocoyl Taurate and Sodium Myristoyl Sarcosinate based Formulae, IFSCC Firenze (2005)

Bigotti C., Guala F., Merlo E., Schwarz M., Villa G., Detergent Application of Acylated Aminoacids, La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, LXXXII, 245-250 (2005)

Bigotti C., Guala F., Merlo E., Villa G., New Applications of Acyl Sarcosinates in Mild Skin Cleansing, Specialità Chemicals Magazine, 11, 40-41 (2005)ù

L. Rigano, E. Merlo, F. Guala, G. Villa, Stabilized Solutions of Zinc Coceth Sulfate for Skin Cleansing and Skin Care, Cosmetic & Toiletries, Vol. 120 n° 4 (2005)

C. Bigotti, F. Guala, E. Merlo, G. Gazzaniga, G. Villa, Zinc and its derivatives: their applications in cosmetic, J. Appl. Cosmetol. 23, 139-147 (2005)

C. Bigotti, F. Guala, E. Merlo, G. Gazzaniga, G. Villa, Potassium Undecylenoyl Hydrolyzed Wheat Protein: A New Surfactant With Dandruff Control Properties, J. Appl. Cosmetol. 24, 47-54 (2006)

C. Andolfatto, F. Guala, A. Bonfigli, E. Merlo, G. Villa, L. Rigano, A N-nitrosoamine-free, efficient thickener for surfactants solutions and its skin substantive properties in mild cleansing: AMP Oleoyl Sarcosine, IFSCC Osaka (2006)

C. Bigotti, F. Guala et al., "Oleoyl Sarcosine: an effective thickener for surfactants solutions", Household and Personal Care Today, supplement to Chimica Oggi, 24(5), pp. 6-8 (2007)

F. Guala, E. Merlo, G. Villa, C. Savino, G. Gazzaniga, L. Rigano, Oleoyl Sarcosine: New Perspectives and Applications", La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, LXXXIV, 237-245 (2007)

L. Rigano, R. Trenti, F. Guala, E. Merlo, G. Villa, Acylated Aminoacids: Multifunctional surfactants for new applications, CTMW 2007

L. Rigano, C. Bigotti, F. Guala, E. Merlo, G. Villa, Oleoyl Sarcosine in hair care, Household and Personal Care Today n 2, XX-XXI (2008)

L. Rigano, C. Bigotti, F. Guala, E. Merlo, G. Villa, New blends for personal care, Household and Personal Care Today n 2, XXII-XXIII (2008)